

УДК 582.683.2:581.144.4

ВПЛИВ ГЕНА *AN3* НА ФОРМУ ЛИСТЯ У *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH

І. В. КИРПИЧОВА

Луганський національний аграрний університет
Україна, 91008, м. Луганськ-8, ЛНАУ, кафедра біології рослин
e-mail: kirinopsis@rambler.ru

*Встановлено, що листові пластинки розеткового листя у мутанта *an3-1* звичайно обернено-ланцетної, рідше довгастої форми, тоді як у дикого типу листя овальної форми. Форма стеблового листя рослин лінії *an3-1* довгастої форми, на відміну від овальної форми у дикого типу.*

*Ключові слова: арабідопсис, гетерофілія, ген *AN3*, форма листя.*

Вступ. Листки – ключові органи для розуміння морфогенезу у рослин [1]. Вивчення листя *A. thaliana* дозволяє зрозуміти фундаментальні механізми контролю розвитку листка, а також вивчити еволюцію розвитку листка [2]. Листку притаманна особливо висока пластичність. Мінливість листя спостерігається не тільки у різних видів, але і у однієї й тієї ж рослини. Вона зумовлена сукупністю зовнішніх та внутрішніх чинників, які визначають його розвиток [3]. У сучасних генетичних дослідженнях *A. thaliana* є найпопулярнішим та зручним рослинним об'єктом. Проте не зважаючи на величезну кількість морфологічних мутантів, тільки деякі з них використані для генетичних досліджень розвитку листка. Гени *ANGUSTIFOLIA (AN)* вважаються ключовими в регулюванні полярності клітин та ширини листової пластинки. Зараз відомі різні гени *AN*, які визначають формування вузького листя, але за рахунок відмінних механізмів [4].

Дана робота присвячена морфологічній характеристиці будови листя у мутанта *an3-1* порівняно з диким типом.

Матеріали і методи

Насіння екотипу Landsberg (La0) та мутантної лінії *an3-1* отримані із Ноттінгемського центру зразків арабідопсису (NASC) [5]. У відповідності з єдиними правилами генетичної номенклатури в тексті використано таке скорочення назви мутації: *an* – *angustifolia* (в пер. з лат. вузьке листя) [6].

Рослини вирощували в ґрунтовій культурі в лабораторії світлокультури на кафедрі біології рослин Луганського НАУ [7]. Ґрунтосуміш готували з ґрунту, піску і торфу у співвідношенні 4:2:1. Насіння висівали в ящики при дотриманні принципу повної рендомізації. Освітлення було цілодобовим (3000–4000 люкс). Всі спостереження та виміри проводили в період початку квітання. Для вимірів із кожної рослини брали найбільший розетковий лист і найбільший стебловий лист.

Результати та обговорення

У більшості випадків за формою листа між рослинами різних екотипів принципової різниці немає. Серед безлічі зразків *A. thaliana* екотип Landsberg широко відомий і часто використовується в різноманітних генетичних дослідженнях. У даній роботі екотип Landsberg використано як дикий (нормальний) тип (WT), стандарт із яким порівнювали мутантну лінію *an3-1* (рис. 1).

Рослинам дикого типу властива гетерофілія (зміна форми листа в межах однієї і тієї ж рослини). Довгочерешкове округле листя поступово змінювалося овальними короткочерешковим (рис. 2). Останні за часом утворення прикореневі листки зазвичай безчерешкові (рис. 2 г, д). Стеблові листки завжди безчерешкові. Верхівки розеткового листа тупі. Верхівки перших за рахунком стеблових листків тупі, а подальших – зазвичай гострі. Основи перших розеткових листків можуть бути округлими або клиновидними, у подальших – клиновидними. Форма основи стеблового листа близька до клиновидної (рис. 2). При онтогенезі відбувається спочатку збільшення кожного наступного листа, а потім їхнє зменшення (кожен наступний стебловий лист менше попереднього).

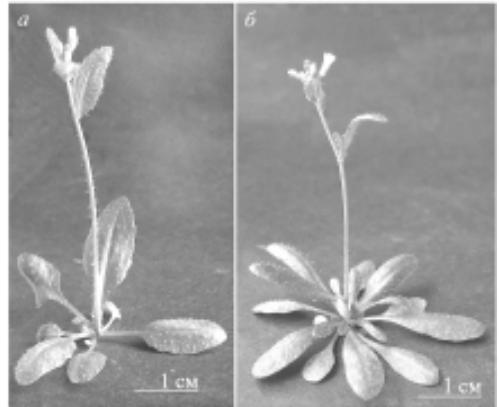


Рис. 1. Квітучі рослини двох різних ліній *A. Thaliana*. а – рослина екотипу Landsberg; б – рослина мутантної лінії *an3-1*

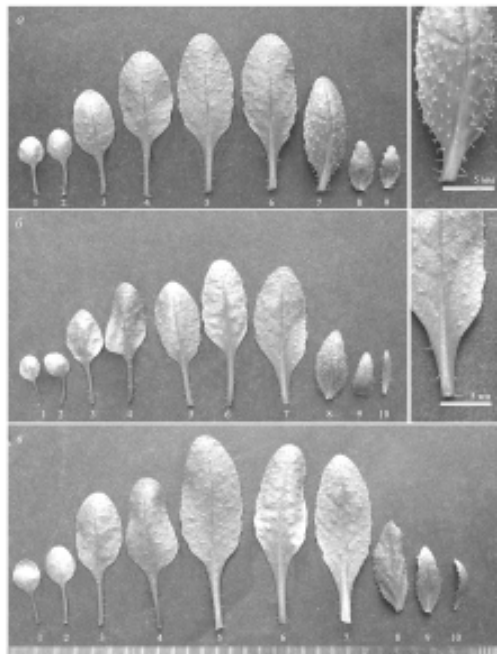


Рис. 2. Листя трьох рослин екотипу Landsberg. а – 1–7 розеткові листки, 8–9 стеблові листки; б – 1–7 розеткові листки, 8–10 стеблові листки (листки рослини зображеної на рис. 1 а); в – 1–7 розеткові листки, 8–10 стеблові листки; г – основа останнього розеткового листа зображеного на рис. 2 а (7 лист); д – основа останнього розеткового листа зображеного на рис. 2 б (7 лист). Пояснення: поділки на шкалі через 0,5 мм

На основі результатів вимірювань, необхідних для встановлення форми листка, обчислювали елементарні статистики, наведені в табл. 1.

Листова пластинка (далі л. пластинка) є найхарактернішою частиною листа. За класифікацією Жуковського П.М. [8] форма л. пластинки визначається з урахуванням відношення довжини листової пластинки до її найбільшої ширини, а також того, в якій частині л. пластинки (верхній, середній або нижній) ширина найбільша.

При довжині л. пластинки, що перевищує ширину в 1,5-2 рази і найбільшою її шириною в середній частині –

форма називається овальною. Якщо довжина перевищує ширину в 3-4 рази, то такий лист називається довгастим; але якщо при цьому найширша частина л. пластинки знаходиться ближче до основи, то лист називається ланцетним, якщо ближче до верхівки, то лист називається обернено-ланцетним. В рамках цієї класифікації не визначено, яким варто вважати лист, якщо відношення довжини л. пластинки до її ширини складає ~ 2,5.

Відношення довжини л. пластинки до її ширини у розеткового листа еко типу La0 складає в середньому 2,18, у стеблового 2,19, а найбільша ширина

Таблиця 1. Елементарні статистики за кількісними ознаками листя *A. Thaliana* еко типу Landsberg

Ознаки	Об'єм вибірки	Середнє арифметичне значення	Помилка середньої	Дисперсія	Середнє квадратичне відхилення	Коефіцієнт варіації, (cv) %
РОЗЕТКОВІ ЛИСТКИ						
Довжина листка	39	2,77	0,06	0,14	0,37	13,4
Довжина л. пластинки	39	2,35	0,05	0,10	0,32	13,8
Довжина черешка	33	0,49	0,04	0,04	0,21	41,8
Ширина л. пластинки	39	1,08	0,02	0,01	0,11	10,5
Відношення довжини л. пластинки до її ширини	39	2,18	0,04	0,07	0,26	11,8
СТЕБЛОВІ ЛИСТКИ						
Довжина л. пластинки	39	1,36	0,04	0,06	0,25	18,1
Ширина л. пластинки	39	0,63	0,03	0,03	0,17	27,4
Відношення довжини л. пластинки до її ширини	39	2,19	0,05	0,10	0,32	14,5
ТРИВАЛІСТЬ ПРЕГЕНЕРАТИВНОГО ПЕРІОДУ						
Число діб до початку квітання	39	27,41	0,39	6,00	2,45	8,9

л. пластинки знаходиться в середній її частині. Форму такого листа ми відносимо до овальної, оскільки отримані результати ближче до значень, при яких лист може вважатися овальним.

Наймінливішою ознакою у розеткового листа є “довжина черешка” ($25\% < cv$); у решти ознак мінливість середня ($10\% < cv < 25\%$) (табл. 1). Мінливість за більшістю кількісних ознак стеблового листа середня, за ознакою “ширина л. пластинки” сильна (табл. 1) [9].

Молекулярно-генетичні дослідження зарубіжних учених показали, що поляризація листка може контролюватися двома способами: розміром клітин (наприклад, у мутанта *an1-1*) і числом клітин (наприклад, у мутантів *an3*; *cro4-1*). У мутанта *an3* вузькі листові пластинки нормальної довжини. Клітини цього мутанта нормального розміру, але число їх в л. пластинці зменшено уздовж центральної осі (жилки) [2].

У друкованих виданнях на генетичних картах місцеположення мутації *an3-1* до теперішнього часу не вказане. Проте в електронних режимах доступу центра зразків арабідопсису ABRC розміщена інформація про те, що ген *AN3* (номер лінії *an3-1* в каталозі ABRC – CS241) локалізований на п'ятій хромосомі [10].

Форма верхівок розеткового листа мутантної лінії *an3-1* тупа, як і у дикого типу La0. У першого крупного стеблового листа форма верхівок тупа, у останніх може бути гострою (рис. 3). Форма основи у всього листа лінії *an3-1* клиновидна (звужені біля основи), тоді як у дикого типу форма основи першого розеткового листа ближче до округлої.

Форма л. пластинок мутантної лінії *an3-1* інша, ніж у дикого типу. Навіть без вимірювань на рис. 3 видно, що у

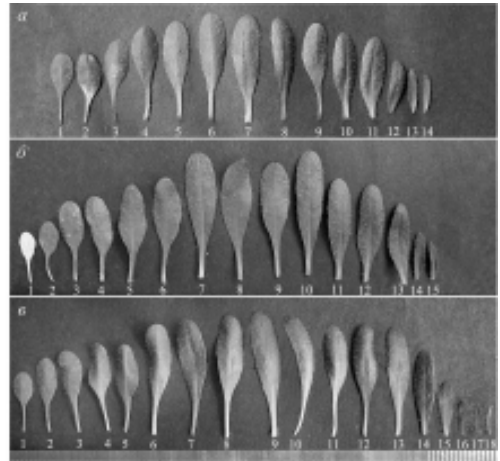


Рис. 3. Листя трьох рослин мутантної лінії *an3-1*: а – 1–10 розеткові листки, 11–14 стеблові листки (листя рослини зображеної на рис. 1 б); б – 1–12 розеткові листки, 13–15 стеблові листки; в – 1–14 розеткові листки, 15–18 стеблові листки. Пояснення: поділки на шкалі через 0,5 мм

деяких листків найширша частина л. пластинки знаходиться ближче до верхівки (наприклад, листки 4, 6 і 7 на рис. 3 а). Як саме називатиметься форма такого листа (обернено-широко-яйцевидна, обернено-яйцевидна або обернено-ланцетна) залежить від відношення довжини л. пластинки до її ширини.

Довжина черешка у першого розеткового листа мутантної лінії *an3-1* приблизно дорівнює довжині л. пластинки (рис. 3). У наступних листків довжина черешка поступово зменшується. В результаті останній розетковий лист часто безчерешковий (рис. 4).

Іноді на рослині безчерешковими є декілька останніх листків (не більше 3). Стеблові листки завжди безчерешкові.

Відношення довжини до ширини у розеткового листа складає 3,31. У приблизно 77 % взятого для вимірювань листа (30 шт. з 39) форма л. пластинок є обернено-ланцетною (найбільша ширина л. пластинок ближче до верхівки). У решти розеткового листа най-

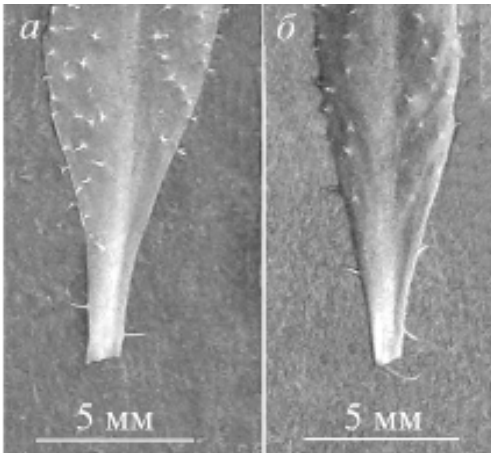


Рис. 4. Основи останнього розеткового листа мутантної лінії *an3-1*: а – фрагмент листа зображеного на рис. 3 б (12 лист); б – фрагмент листа зображеного на рис. 3 в (14 лист)

ширшою була середня частина, тому форма л. пластинок вважається довгастою. У стеблового листа форма довгаста (відношення довжини до ширини 3,51; найбільша ширина в середній частині).

Мінливість у розеткового листа за ознакою “довжина черешка” сильна, за рештою ознак середня. У стеблового листа за всіма ознаками середня.

Результати вимірювань найкрупнішого розеткового і стеблового листа наведено в табл. 2.

Мутантний алель *an3-1* впливає на всі кількісні ознаки розеткового і стеблового листа (табл. 3). Найсильніше у мутантної лінії зменшується ширина л. пластинки розеткового листа (на 44,5 %). Проте мутація *an3-1* зменшує

Таблиця 2. Елементарні статистики за кількісними ознаками листа *A. thaliana* мутантної лінії *an3-1*

Ознаки	Об'єм вибірки	Середнє арифметичне значення	Помилка середньої	Дисперсія	Середнє квадратичне відхилення	Коефіцієнт варіації, (cv) %
РОЗЕТКОВІ ЛИСТКИ						
Довжина листка	39	2,35	0,04	0,07	0,27	11,4
Довжина л. пластинки	39	1,98	0,05	0,09	0,31	15,5
Довжина черешка	33	0,37	0,02	0,02	0,15	40,0
Ширина л. пластинки	39	0,60	0,01	0,004	0,06	10,1
Відношення довжини л. пластинки до її ширини	39	3,31	0,07	0,19	0,44	13,3
СТЕБЛОВІ ЛИСТКИ						
Довжина л. пластинки	39	1,31	0,04	0,07	0,26	19,9
Ширина л. пластинки	39	0,38	0,01	0,006	0,08	20,7
Відношення довжини л. пластинки до її ширини	39	3,51	0,09	0,32	0,57	16,2
ТРИВАЛІСТЬ ПРЕГЕНЕРАТИВНОГО ПЕРІОДУ						
Число діб до початку квітування	39	33,97	0,39	6,08	2,47	7,3

значення і ряду інших ознак. Приблизно однаково зменшуються довжина розеткового листя і довжина л. пластинки (на ~ 15%). Значно зменшується і довжина черешка (на 25 %) (табл. 3). На ширину стеблового листя мутантний алель *an3-1* впливає так само сильно (зменшує на 40,8 %), як і на розеткові листки. На довжину стеблового листя мутація *an3-1* майже не впливає (зменшує незначучо на 3,8 %).

У результаті сильного зменшення ширини розеткового і стеблового листя змінюється відношення довжини л. пластинки до її ширини. В даному ви-

падку це значення більше, ніж у дикого типу; як у розеткового, так і стеблового листя більше ніж на 50 %.

Мутація *an3-1* впливає і на організм рослини в цілому, оскільки змінюється значення ознаки “число діб до початку квітування” (табл. 1 і 2). При порівнянні середніх значень за t-критерієм Стьюдента встановлено, що $t=11,80^{***}$, $t_{st}=\{-2-2.6-3.4\}$, $t > t_{st}$, $p<0.001$. Різниця середніх склала $6,6\pm 0,6$ (24 %). Квітування у мутантної лінії *an3-1* починається в середньому на тиждень пізніше, ніж у дикого типу Landsberg.

Таблиця 3. Порівняння кількісних ознак мутантної лінії *an3-1* і дикого типу (Landsberg) за t-критерієм Стьюдента

Показники	Ознаки				
	довжина листка	довжина л. пластинки	ширина л. пластинки	відношення довжини л. пластинки до її ширини	довжина черешка
Розеткові листки					
Середнє значення <i>an3-1</i>	2,35±0,04	1,98±0,05	0,60±0,01	3,31±0,07	0,37±0,02
Середнє значення Landsberg	2,77±0,06	2,35±0,05	1,08±0,02	2,18±0,04	0,49±0,04
Різниця	-0,41±0,07	-0,37±0,07	-0,48±0,02	1,13±0,08	-0,12±0,04
Різниця, %	-15,1	-15,8	-44,5	51,6	-24,9
t- критерій Стьюдента	5,71***	5,20***	23,34***	13,75***	2,86**
Стеблові листки					
Середнє значення <i>an3-1</i>	–	1,31±0,04	0,38±0,01	3,51±0,09	–
Середнє значення Landsberg	–	1,36±0,04	0,64±0,03	2,19±0,05	–
Різниця	–	-0,05±0,06	-0,26±0,03	1,32±0,1	–
Різниця, %	–	-3,8	-40,8	60,1	–
t- критерій Стьюдента	–	0,89	8,48***	12,65***	–

Примітки: ** – значення дуже значучо, вірогідність помилки $0.001 < p \leq 0.01$; *** – значення максимально значучо, вірогідність помилки $p \leq 0.001$.

Висновки

Мутація *an3-1* найсильніше впливає на ширину розеткового і стеблового листа. Приблизно в рівній мірі зменшується ширина як розеткового листа (на 44,5 %), так і стеблового (на 40,8 %).

Під впливом мутації *an3-1* довжина листка і довжина л. пластинки розеткового листа зменшуються на ~ 15 %.

Листові пластинки розеткового листа обернено-ланцетної форми (77 % вивченого листа) і довгастої форми (23 %), тоді як у дикого типу листа овальної форми.

Під впливом мутантного алеля *an3-1* довжина черешка розеткового листа значно зменшується (в середньому на ~ 25 %).

Листові пластинки стеблового листа рослин лінії *an3-1* довгастої форми, на відміну від овальної форми у дикого типу. Така форма стеблового листа обумовлена зменшенням ширини л. пластинок, тоді як довжина л. пластинок майже не зменшується (на 3,8 %) порівняно з диким типом.

Мутація *an3-1* збільшує період від посіву до початку квітання в середньому на тиждень.

Перелік літератури

1. Kim G., Shoda K., Tsuge T., Cho K., Uchimiya H., Yokoyama R., Nishitani K., Tsukaya H. The *ANGUSTIFOLIA* gene of *Arabidopsis*, a plant CtBP gene, regulates leaf-cell expansion, the arrangement of cortical microtubules in leaf cells and expression of a gene involved in cell-wall formation // *The EMBO journal*. – 2002. – Vol. 21, N 6. – P. 1267–1279.
2. Tsukaya H. Leaf Development // Doi. – 2002. – 10.1199/0072.
3. Федоров Ал. А., Кирпичников М.Э., Артюшенко З.Т. Атлас по описательной морфологии высших растений: Лист. – М. – Л.: Изд-во АН СССР, 1956. – 302 с.

4. Tsuge T., Tsukaya H., Uchimiya H. Two independent and polarized processes of cell elongation regulate leaf blade expansion in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // *Development*. – 1996. – Vol. 122. – P. 1589–1600.
5. *Seed List*. The Nottingham Arabidopsis Stock Centre. – Nottingham: The University of Nottingham, 1994. – 147 p.
6. Ежова Г.А., Лебедева О.В., Огаркова О.А. и др. *Arabidopsis thaliana* – модельный объект генетики растений. – М.: МАКС Пресс, 2003. – 220 с.
7. Соколов І.Д., Шеліхов П.В., Соколова Т.І. та інші. Генетика. Практикум. – Київ: Арістей, 2003. – 176 с.
8. Жуковский П. М. Ботаника. – М.: Колос, 1982. – 623 с.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
10. *AtEnsembl v35: Arabidopsis thaliana Gene report for AT5G28640*. Режим доступа [http://atensembl.arabidopsis.info/Arabidopsis_thaliana_TAIR/gene-view?db=core;gene=AT5G28640-T]

Представлено С.С. Малютою
Надійшла 15.05.2008

ВЛИЯНИЕ ГЕНА AN3 НА ФОРМУ ЛИСТЬЕВ У *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.

И. В. Кирпичева

Луганский национальный аграрный университет
Украина, 91008, г. Луганск-8, ЛНАУ,
кафедра биологии растений
e-mail: kirinopsis@rambler.ru

Установлено, что листовые пластинки розеточных листьев у мутанта *an3-1* обычно обратно-ланцетной, реже продолговатой формы, тогда как у дикого типа листья овальной формы. Форма стеблевых листьев растений линии *an3-1* продолговатой формы, в отличие от овальной формы у дикого типа.

Ключевые слова: арабидопсис, гетерофиллия, ген AN3, форма листьев.

INFLUENCE OF GENE *AN3* ON THE FORM OF LEAVES *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.

I. V. Kirpicheva

Lugansk national agrarian university;
Ukraine, 91008, Lugansk-8, LNAU,
department of biology
e-mail: kirinopsis@rambler.ru

It was stated, that sheet plates rosette leaves of a mutant *an3-1* back-lanceolate, rarer oblong form, while a wild type leaves of oval form. Form of stem leaves of plants line *an3-1* oblong form, unlike an oval form a wild type.

Key words: arabidopsis, heterophylly, gene AN3, form of leaves.